

ISSN 2238-9113**ÁREA TEMÁTICA:**

- COMUNICAÇÃO
- CULTURA
- DIREITOS HUMANOS E JUSTIÇA
- EDUCAÇÃO
- MEIO AMBIENTE
- SAÚDE
- TRABALHO
- TECNOLOGIA

VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE TITULAÇÃO PARA ROTEIROS DE AULA PRÁTICA NA DISCIPLINA DE BIOQUÍMICA

Talita Lara Dos Santos (talitalaras@hotmail.com)
Vanessa Egéa Dos Anjos (vanessaegea.quim@gmail.com)
Juliana Inaba (jinaba@uepg.br)
Adriano Gonçalves Viana (adrianogviana@gmail.com)

RESUMO - Aulas práticas desenvolvidas em Bioquímica e em outras disciplinas ministradas na Universidade são uma importante ferramenta que proporciona aos alunos uma maior compreensão sobre os assuntos teóricos facilitando o seu aprendizado. O roteiro aqui apresentado relaciona o desenvolvimento e validação de titulações que possam ser utilizadas em aulas práticas, uma delas centrada no processo de fermentação alcoólica, dentro do tema metabolismo de carboidratos e a outra relacionando a interferência do pH na desmineralização do cálcio de cascas de ovo. O objetivo principal do trabalho foi avaliar o método de titulação com solução nitrocromica de dicromato de potássio que evidencia a produção de etanol mediante fermentação alcoólica de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, bem como validar o método de titulação com ácido etilendiaminotetracético (EDTA) utilizado para quantificar o teor de cálcio liberado no meio reacional de amostras de cascas de ovo tratadas em diferentes pHs, contemplando os materiais e equipamentos disponíveis em laboratório. A validação dos métodos evidenciou sua sensibilidade, garantindo assim resultados confiáveis no desenvolvimento dos mesmos em sala de aula.

PALAVRAS-CHAVE – Bioquímica, Aula prática, Titulação.

Introdução

Aulas práticas desenvolvidas com o intuito de facilitar a compreensão e desenvolver um raciocínio crítico e científico dos alunos são de suma importância tanto na disciplina de Bioquímica como em outras disciplinas. Desta forma, assuntos teóricos complexos podem ser reproduzidos de maneira didática que facilitam o aprendizado e ampliam a visão do aluno sobre os temas anteriormente estudados em sala de aula..

Assuntos como catabolismo de carboidratos, importante via bioquímica celular de produção de energia, onde hexoses (açúcares com 6 átomos de carbono) são convertidas por meio da glicólise (via central do catabolismo de carboidratos) em 10 reações sequenciais a

duas moléculas de piruvato. O piruvato por sua vez, pode seguir três rotas bioquímicas distintas, dependendo da disponibilidade de oxigênio: em aerobiose segue a rota da respiração celular; já em condições de anaerobiose pode seguir a fermentação láctica (mamíferos) ou alcoólica (leveduras). Na fermentação alcoólica o piruvato sofre a ação das enzimas piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase sendo reduzido a duas moléculas de dióxido de carbono e álcool etílico, que pode então ser quantificado para comprovação das reações existentes.

Por sua vez, a interferência do pH é um assunto discutido em diversas reações bioquímicas. Soluções de pH ácido são capazes de promover a desmineralização do cálcio em cascas de ovo, podendo esse conceito ser aplicado também à remoção de minerais do esmalte dentário, podendo induzir à formação de cáries.

Em práticas desenvolvidas no laboratório, os processos de titulação fazem parte de métodos clássicos utilizados há muito tempo para identificar a concentração de uma substância desconhecida. Por meio dela podemos identificar a presença de substâncias provenientes de reações bioquímicas ocorridas no meio reacional e quantificá-las, relacionando os resultados com diversos conceitos como catálise e inibição enzimática, mecanismos de óxido-redução e transferência de energia. Portanto, torna-se necessário o desenvolvimento e validação de métodos que possam ser desenvolvidos em aula, relacionados a assuntos teóricos, contemplando os materiais disponíveis em laboratório.

Objetivos

O presente trabalho foi realizado no intuito de se desenvolver e validar titulações que possam ser utilizadas em aulas práticas, uma delas centrada no processo de fermentação alcoólica, dentro do tema metabolismo de carboidratos e a outra relacionando a interferência do pH na desmineralização do cálcio de cascas de ovo. Desta forma as titulações propostas permitem quantificar o teor de álcool etílico produzido durante o processo fermentativo da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, bem como quantificar o teor de cálcio liberado no meio reacional de amostras de cascas de ovo tratadas em diferentes pHs. Desse modo, espera-se que ao desenvolverem os experimentos os alunos sejam capazes de relacionar o tema discutido em aula teórica com os processos observados no laboratório.

Referencial teórico-metodológico

TITULAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁLCOOL ETÍLICO

A determinação do teor de álcool etílico produzido durante a fermentação alcoólica foi realizada por meio de titulação com solução nitrocromica, segundo Mossini et al. (2011). Amostras de 0,5 mL da solução fermentada foram tratadas com 1,0 mL de solução nitrocromica de dicromato de potássio ($0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ em ácido sulfúrico concentrado) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Nesta etapa ocorre a reação de oxidação do etanol presente na solução fermentada pelo dicromato de potássio, em meio fortemente ácido, resultando em ácido acético (figura 1). O processo pode ser acompanhado pelo surgimento da coloração verde no sistema.

Figura 1: Reações químicas observadas na oxidação do etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) pelo dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) resultando em formação de ácido acético (CH_3COH)



O excesso de dicromato de potássio não utilizado na oxidação do etanol é então utilizado para oxidar uma solução de iodeto de potássio (KI) a iodo (I_2). Para tanto, adicionaram-se 12,5 mL de água, juntamente com 5 mL de iodeto de potássio (20g%). O iodo liberado na reação é então titulado com uma solução de tiosulfato de sódio ($0,03 \text{ mol.L}^{-1}$), que age como agente redutor removendo o iodo da reação. Para observar a reação faz-se necessário o uso de goma de amido (1%) como indicador, que em presença de iodo forma um complexo de coloração azul intensa. Na ausência de iodo a amostra tornasse incolor, indicando o final da titulação. A concentração de etanol é então calculada com base na equivalência: 0,115 mg de etanol corresponde a 1,0 mL de tiosulfato de sódio $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$.

VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Com o intuito de conhecer a sensibilidade do método acima descrito e garantir assim resultados confiáveis no desenvolvimento do mesmo em sala de aula, foram realizados experimentos de validação. Soluções hidroalcoólicas de 10%, 50% e 99% foram preparadas e submetidas a análise em viscosímetro, para verificar a densidade de cada solução, utilizando esse valor para realizar os cálculos e conhecer o teor exato de álcool contido em cada amostra. Posteriormente, as amostras de concentração conhecida foram analisadas através da titulação acima proposta. Com os valores dos volumes gastos foram feitos os cálculos necessários para comparação dos resultados.

TITULAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CÁLCIO

Para quantificar o teor de cálcio liberado de cascas de ovo, tratadas em soluções com diferentes pHs, e assim determinar onde a desmineralização do cálcio foi mais intensa, foi realizada titulação com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) composto orgânico que age como quelante, formando complexos estáveis com vários íons metálicos. Amostras de cascas de ovo, tratadas individualmente durante 7 dias, em pH neutro e em pH ácido foram submetidas a análise, adicionando-se em um frasco 10,0 mL da amostra de solução de casca de ovo, 10,0 mL de água destilada e gotas de NaOH (3%) até que a solução estivesse com pH 12,0, com auxílio das tiras indicadoras de pH. Foram utilizadas 3 gotas do indicador Calcon (1%), que se complexa fracamente ao cálcio presente no meio reacional, deixando a solução com coloração inicial rosa. Realizou-se a titulação com solução de EDTA ($0,01 \text{ mol.L}^{-1}$), até a viragem do indicador para a cor azul, indicando que o cálcio se desligou completamente do indicador, que isolado muda de cor, e se complexou de maneira estável ao EDTA. Com o volume gasto de EDTA realizaram-se os cálculos.

VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Para evidenciar a sensibilidade do método de titulação proposto, e assim obter resultados exatos, foi preparado uma solução padrão de CaCO_3 ($0,01 \text{ mol.L}^{-1}$), com a qual foram feitas as titulações. Em balão volumétrico de 100 mL foi pesado 1,0 g de CaCO_3 e adicionada solução de HCl 1:1, até completa dissolução do precipitado, tornando o cálcio solúvel. Completou-se o volume do balão obtendo uma solução de concentração $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$. Essa solução foi diluída para preparação de soluções de concentração $0,0001 \text{ mol.L}^{-1}$, $0,0002 \text{ mol.L}^{-1}$, $0,0004 \text{ mol.L}^{-1}$, $0,0006 \text{ mol.L}^{-1}$, $0,0008 \text{ mol.L}^{-1}$, $0,001 \text{ mol.L}^{-1}$, que foram submetidas a análise acima citada da titulação com EDTA, em triplicata. Com a média do volume gasto em cada titulação, foi possível realizar os cálculos e comparar com os valores obtidos com as concentrações conhecidas das soluções.

Resultados

Através da validação do método de titulação com solução nitrocromica de dicromato de potássio, utilizada para determinar o teor de álcool de diferentes amostras, foi possível obter os valores necessários para o desenvolvimento dos cálculos, podendo assim comparar os resultados (tabela 1). Com base nos resultados obtidos, foi possível observar que o método apresentou-se viável para amostras com teor alcoólico abaixo de 10%, visto que acima disso o

método não é sensível e não reproduz resultados confiáveis. Portanto, a partir dos experimentos de validação realizados, assegura-se que esse método de titulação pode ser aplicado na quantificação do teor de álcool formado na fermentação alcoólica, já que o mesmo é de aproximadamente 4%.

Tabela 1 - Massa de álcool obtida através da densidade em comparação com a massa de álcool obtida por meio da titulação

Teor de álcool	Massa de álcool obtida por meio da densidade	Massa de álcool obtida por meio da titulação
10%	0,5072 mg/5mL	0,50 mg/5mL
50%	0,5369 mg/5mL	5,75 mg/5mL
99%	0,6166 mg/5mL	5,88 mg/5mL

Com os testes realizados com cascas de ovo em diferentes pHs observamos que a concentração de cálcio presente na solução ácida foi de 0,006015 g de Ca^{2+} /100 mL, e a solução neutra apresentou 0,003208 g de Ca^{2+} /100 mL, sugerindo que o pH ácido contribui para a desmineralização do cálcio no meio reacional.

Mediante os testes de validação aplicados na titulação com EDTA foram obtidos dados que serviram de base para realização dos cálculos. De acordo com resultados obtidos, esse método mostrou-se sensível, já que a titulação reproduziu valores próximos à concentração conhecida de cada amostra (tabela 2). Desse modo, concluímos que essa metodologia pode ser aplicada com a finalidade de quantificar o teor de cálcio desmineralizado das cascas de ovo tratadas em diferentes pH.

Tabela 2 - Concentração de cálcio das soluções diluídas de CaCO_3 e concentração de cálcio obtida por meio da titulação com EDTA

Concentração da solução de CaCO_3 diluída	Concentração de Cálcio na solução de CaCO_3 diluída	Concentração de Cálcio obtida por meio da titulação
0,0001 mol	0,004 g de Ca	0,0044 g de Ca
0,0002 mol	0,008 g de Ca	0,008 g de Ca
0,0004 mol	0,016 g de Ca	0,0164 g de Ca
0,0006 mol	0,024 g de Ca	0,0244 g de Ca
0,0008 mol	0,032 g de Ca	0,032 g de Ca
0,001 mol	0,04 g de Ca	0,0408 g de Ca

Essa prática pode ser realizada com outros materiais como dentes ou conchas, podendo assim ser aplicada de forma mais específica à área dos diferentes cursos que apresentam a disciplina de Bioquímica.

Considerações Finais

Foram realizados experimentos de validação de titulações e avaliação da sensibilidade desses métodos, garantindo que as práticas reproduzam resultados satisfatórios. Essas práticas ao serem inseridas no programa da disciplina de Bioquímica da UEPG, permitirão aos alunos evidenciarem a formação e quantificação de álcool etílico e cálcio em diferentes processos, correlacionando esses eventos aos mecanismos de catabolismo de carboidratos, ação enzimática e biotecnologia.

Apoio: Programa BEC – Programa de Apoio a Ações Afirmativas para Inclusão Social em Atividades de Extensão - Fundação Araucária.

Referências

LEHNINGER, A.; NELSON, D. L. & COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 5ª Ed. SP/SP, Editora Sarvier, 2011.

MOSSINI, S.A.G.; INOUE, J.K.; JUNIOR, M.M.; NISHIYAMA, P. Validação do método titulométrico para determinação de etanol em sangue utilizando ácido nítrico 54% e ácido sulfúrico concentrado. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 43, n. 2, p. 100-105, 2011.

NASCIMENTO, A. J. et al. **Bioquímica – aulas práticas**. 6ª. Ed. Editora UFPR, 2002.

VOGEL, A. I. **Análise Química Quantitativa**. 6ª. Ed. Rio de Janeiro. LTC, 2013.

MORITA, T. **Manual de soluções, reagentes e solventes: padronização, preparação, purificação**. São Paulo: Edgard Blucher, 1968. 630 p. ISBN 85-212-0118-4